

機関番号：32701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580347

研究課題名 (和文) カエルツボカビの日本在来種への影響とその対策

研究課題名 (英文) Analysis of the Influence and Measure of Chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) for native amphibian species in Japan

研究代表者

宇根 ユミ (UNE YUMI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：40160303

研究成果の概要 (和文)：我々はアジア初のツボカビ症 (Bd) を見出した。国内の野生両生類における Bd 浸淫状況と、病性鑑定および感染実験によって在来種の Bd への抵抗性を明らかにした。また、発症と保菌個体を用いて効果的で安全な治療法と除菌法を確立した。さらに、6つの両生類大量死事例よりラナウイルス 2 種類 (RCV-JP、HNV) を見出した。そして、感染実験により 11 種類の在来種への両ウイルスの高致死性 (死亡率 84.0%) を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We discovered chytridiomycosis for the first time in Asia. The situation of chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis* : Bd) in native wild amphibians in Japan and the resistance of native species to Bd were clarified by the pathological examination of mass die-offs and the infection experiment using native amphibians. We also established effective and safe treatment/eradication of Bd by experiments using affected animals and career. Two ranavirus strains (RCV-JP and HNV) were isolated and established from 6 mass die-offs of amphibian. And, high mortality rate (84.0%) was clarified by the ranavirus challenge experiments using 11 native species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産・獣医学、応用獣医学

キーワード：カエルツボカビ、ラナウイルス、両生類、大量死、生態系・生物多様性の保全

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、2006年12月にアジア初のツボカビ症を発見した。ツボカビ症の原因であるカエルツボカビ (Bd) は、2008年5月に国際獣疫事務局 (OIE) により、世界規模で起きている両生類の絶滅と減少に関わる重要な病原体として、監視すべき重要な野生動

物の感染症リストに掲載された。しかしながら、2008年当時、Bdの日本国内における浸淫状況は把握されておらず、在来種への影響の評価もされていなかった。さらに、同じくOIEリストに掲載されているラナウイルスの存在さえも確認されていなかった。

日本は中緯度に位置する国として、両生類

に稀にみる多様性があり、58種が生息しており、その84.1%が固有種である。日本の生物学的財産ともいえる生態系を感染症の脅威から守るため、早急に2つの病原体の実態把握、在来種への影響を評価して、対策を講じる必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、在来種への脅威となる感染症/病原体を早期に発見、その影響を排除あるいは最小限に抑える対策の確立を最終目標とした。発見された病原体に対しては、在来種へのリスク評価、国内流行実態の把握、効果的かつ効率的な対策を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) カエルツボカビに関する研究

① 飼育下両生類におけるツボカビ症の発生状況調査：飼育下両生類におけるツボカビ症の発生状況を把握するため、病性鑑定の依頼を受けた個体に加えて、国内販売されている個体を購入して、34種、330匹の両生類を病理学および分子生物学的（Nested-PCR法）に検索した。

② 野生下両生類の不審死、大量死事例の病性鑑定：飼育下両生類でのツボカビ症の流行状態を把握すると並行して、環境省、全国の地方自治体、生態研究者、自然観察者や一般人から提供された野生下両生類の不審死・大量死事例の病性鑑定を実施した（病理学および分子生物学的検索）。

③ オオサンショウウオにおけるカエルツボカビ保有率と除菌実験：漂流・死亡したオオサンショウウオ10匹を対象として、病理学および分子生物学的に検索し、カエルツボカビの高感染部位と感染率を検索した。また、カエルツボカビ陽性オオサンショウウオを用いて抗真菌剤（イトナコナゾール）による除菌法を検討した。

④ ツボカビ症の治療法の検討：自然発生のツボカビ症発症例5種12匹を対象として、抗真菌剤（イトナコナゾール）による治療法を検討した。

⑤ 感染実験によるカエルツボカビの在来種への影響の評価：飼育下外来種においてツボカビ症の流行が確認されたことから、飼育水排出に起因する在来種への感染拡大を考慮し、在来種への感染実験を行った。a) 発症したカエルの飼育水を用いた実験：沖縄県指定天然記念物3種を含む在来種20種184匹への感染実験を行った。b) 樹立した培養株（後述）を接種材料として、ヌマガエルに

接種した。陽性対象にはカエルツボカビに感受性を示す2種類の外来のカエルを用いた。⑥ カエルツボカビ培養株の樹立および銅イオンの影響：飼育下外来種のツボカビ症個体の皮膚組織より、PmTG液体培地を使用して培養株樹立を試みた。

さらに、樹立株を用いて、簡便、効果的な除菌薬の検討を行なった。すなわち、養魚施設で水カビ発生の抑制に効果を上げている銅イオンの有効性を検討した。種々の銅イオン濃度のPmTG培地で、カエルツボカビを培養し、経時的に遊走子数をカウントした。

⑦ 自然界におけるカエルツボカビ浸淫状況把握のためのモニター動物の検討：五箇らの研究によって、オオサンショウウオ、シリケンイモリで保有率が高いことが明らかになったが、この2種の動物の生息地は限定されており、広範囲でのカエルツボカビの国内分布を把握するためには適していない。そこで、カエルツボカビ保有率が高く、国内に広範囲に生息するウシガエル幼生に注目して、この動物がモニター動物として有用であるか否かを病理学および分子生物学的に検討した。

### (2) ラナウイルスに関する研究

① 両生類大量死事例の検索によって発見されたラナウイルス感染症と診断法の確立：両生類の大量死事例の通報を受け、提供された検体について病理学および分子生物学的検索を行った。その過程で、発見されたラナウイルス感染症の病理学的特徴を明らかにするとともに、診断法の確立をめざした。

② 遡及的ラナウイルス感染症の調査：ラナウイルス感染症の診断法の確立を受けて、ツボカビ症の流行モニタリングのために提供された事例についてラナウイルスの遡及的調査を実施した。

③ RCV-JP、HNVの在来両生類への感染実験：ウシガエルとカスミサンショウウオの大量死事例からRCV-JPとHNVの2種類のラナウイルスを分離・同定し、培養に成功したことから、RCV-JPならびにHNVの在来種への病原性を検証するため、無尾目5種および有尾目6種242匹（対象97匹）用いた感染実験を行った。

④ 国内ラナウイルス浸淫調査と季節変動：ツボカビ症の発見に続いて、ラナウイルス感染症の流行も確認されたことから、国内でのラナウイルス浸淫状況を把握するため、流行地を含め、全国8箇所においてウシガエル幼生を採取し、PCR検査を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) カエルツボカビに関する研究成果

① 飼育下両生類におけるツボカビ症の発生状況調査：飼育下両生類の病性鑑定および疫学調査により、国内 15 箇所において 9 種計 94 匹においてツボカビ症を確認し、繁殖施設から一般愛好家まで、広く流通経路でツボカビ症が流行していることを明らかにした。死亡個体は外来種のみであり、ハプロタイプ解析の結果 A または C と判明した。飼育下外来種におけるカエルツボカビの病原性の強さが確認された。



図1 ツボカビ症 (ベルツノガエル)、体軀の硬直、皮膚の乾燥感、脱皮亢進(皮膚の煤け)

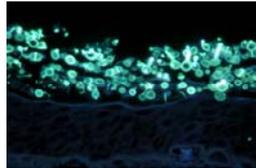


図2 ツボカビ症 (アマゾンツノガエル)、組織標本、ファンギフロラ Y 染色。皮膚角質層内の大量の遊走子囊(緑色蛍光を示す)

② 野生下両生類の不審死、大量死事例の病性鑑定：2007 年から 2010 年までに約 60 事例の検索を行なった。野生下両生類の病性鑑定の結果、ツボカビ症と診断される事例は確認されなかった。死因としては、ラナウイルス感染症、急激な気温の変化、溺死、捕殺、耕運機などによる外傷などが挙げられ、現時点において野生在来種へのカエルツボカビの影響はないあるいはかなり低いものと判断された。しかしながら、ラナウイルス感染症は、ウシガエル 5 事例およびカスミサンショウウオ 1 事例の大量死として発見され、両生類の重要な感染症であると判断された。



図3 産卵場所における大量死 (アカガエル、50 匹以上)。体に咬傷が確認され、アライグマなどによる捕殺が考えられた事例。

③ オオサンショウウオにおけるカエルツボカビ保有率と除菌実験：10 匹のオオサンショウウオの 1) 口周囲、目およびその周囲、2) 腹部、3) クロアカおよび尾、4-7) 四肢指端からスワブを採取して PCR 検査した結果、指端の陽性率が高く、40%の保菌率であった。よって、指端スワブで陽性となった 4 匹のオオサンショウウオを、0.1%イトナコナゾール水溶液に、1 日 5 分、10 回浸漬した。その結果、浸漬 5 回で、PCR 検査陰性となり、その後、実験終了の 2 週間後まで陰性のままで

あった。また、副作用は観察されなかった。以上、低濃度薬液を用いた短時間の薬浴によってカエルツボカビの完全な除菌が確認された。有尾目を対象としたカエルツボカビ除菌研究の報告は少ない。今回の確立した除菌法は、稀少な有尾目が多く生息する日本における生息域外繁殖事業に貢献するものと考えられる。

④ ツボカビ症の治療法の検討：受診時に重篤な症状を示していた幼若 1 個体を除くすべての動物で、カエルツボカビの除菌に成功し、臨床症状の改善を認めた。追跡調査においてもツボカビ症の再発は認められず(最長で 57 日間)、色素消失などの副作用も確認できなかった。以上のことから、効果的かつ安全な治療法の確立することができた。



図4 イトナコナゾールによるカエルツボカビ治療実験 治療前 (タイガーサラマンダー)、全体的に体色がくすんでいる。黄色の部位が黒色調と成っている。



図5 イトナコナゾールによるカエルツボカビ治療実験 治療後 (左図と同一症例)、黄色の部位が鮮明になっている。

⑤ 感染実験によるカエルツボカビの在来種への影響の評価：a) 飼育水を用いた感染実験：20 種類の両生類のうち、ヌマガエル、コガタハナサキガエル、ヤエヤマハラブチガエルの 3 種類が、PCR 検査および病理学的にツボカビ症を発症したと判断された。しかしながら、外来の両生類のツボカビ症でよく観察される脱皮亢進は目立たず、いずれも急死であった。b) 培養株を用いた感染実験：ヌマガエルに感染が成立し、さらに PCR 検査によるカエルツボカビ定性的検査を経時的に行なったところ、感染量が増加し、ついには、死亡した。しかし、病理学的にはツボカビ症を死因とするものはなかった。以上の結果から在来種は、カエルツボカビに対して、一定の抵抗性を有しているものと考えられた。

⑥ カエルツボカビ菌培養株の樹立および増殖における銅イオンの影響：ツボカビ症を発症した外来両生類の皮膚を滅菌水によって洗浄する。これを繰り返し皮に付着している雑菌を可能な限り少なくする。その脱皮皮を固形培地表面で丹念に牽引し、カエルツボカビの遊走子囊を培地表面に塗布する。汚染が高度で培養株を樹立するために 1 年以上を要した。樹立された培養株の維持は容易で、PmTG 液体培地で増菌可能である。なお、長期に培

養すると遊走子嚢が小型化し、さらに、遊走子嚢内にさらに遊走子嚢が形成されるといった増殖異常が生じた。

銅イオンのカエルツボカビへの影響：培養液内銅イオン濃度が0~4ppmの各群では、増殖抑制は認められなかった。5ppm以上で抑制できた。以上の結果より、銅イオンがカエルツボカビに対して抑制的に働くことがわかったが、通常、養魚場で水カビ防止に用いる濃度に比較して高濃度で、本邦の排水基準3ppmを考慮すると使用方法が限定される。しかしながら、銅イオン濃度1ppm下では、ほとんどの細菌およびカビの増殖を抑制できるため、カエルツボカビの選択培地として利用できる可能性がある。

⑦自然界におけるカエルツボカビ浸淫状況把握のためのモニター動物の検討：カエルツボカビは、幼生ではケラチンが分布する口器にのみ感染しているため、ウシガエル幼生の口器を肉眼的に観察し、PCR検査(スワブ)および病理組織学的に検索した。口器ツボカビ症の特徴的肉眼像として、嘴の色素消失(瀰漫性または部分的)、不規則な肥厚が挙げられた。また、カエルツボカビは嘴の角化層に多く感染していた。ウシガエルは外来生物として日本中に生息しており、幼生は成体に比べて採取しやすく、幼生で越冬するため、カエルツボカビの暴露機会が多く、効率的に感染を反映するものと考えられ、ウシガエル幼生は、カエルツボカビの国内分布やハプロタイプの地域性などを検討する上で、大変有用なモニター動物になるものと判断した。



図6 ウシガエル幼生の口器 嘴の色素消失と嘴の肥厚



図7 ウシガエル幼生の口器、組織標本。角質層内に多数の遊走子嚢が観察される

## (2) ラナウイルスに関する研究成果

① 両生類大量死事例の検索におけるラナウイルスの発見と診断法の確立：両生類の大量死事例の検索を行なっている過程で、ウシガエル幼生のラナウイルス感染症を見出した。2008年9月下旬より流行が生じ、ピーク時に3-4日間で、数千匹の死体が回収された。肉眼的には、体腔水腫、皮膚潰瘍、指端、尾の壊死・脱落があり、組織学的には、腎糸球体壊死、尿細管変性と肝細胞のびまん性壊死を認め、電子顕微鏡観察にて糸球体内皮細胞にウ

イルス粒子を認めた。また、主要カプシドタンパク質(MCP)をコードする遺伝子の塩基配列が既報のラナウイルスとは異なることから、RCV-JPと命名した。なお、2009年同一水系を含む半径35km内でウシガエルの大量死が4事例確認され、検索可能であった3事例がRCV-JP感染症と診断された。

ラナウイルス感染症の診断に際しては、前述の病理学的所見に加えて、必発ではないが、好塩基性細胞質内封入体の存在は診断的価値が高い。また、ウイルス検出のためには腎臓が最も適している。PCR検査用のプライマーとして、MCPに関連するセット1: Rana M68F, BIV MCP 154 (約230bp)、セット2: FV3MCP4F, FV3MCP5 (約530bp)、セット3: RanaJP556, RanaJP772 (約217bp)を推奨する。また、国内には異なる種類のラナウイルスが存在するため、セット1で疑わしい結果が得られた場合、他のセットによる検証が必要と考える。

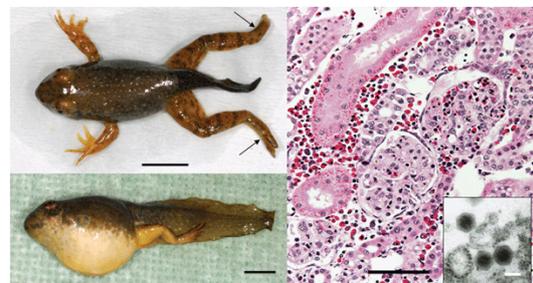


図8 RCV-JP感染症  
左上:幼体の指端の消失、左下:体腔水腫  
右:腎糸球体壊死と尿細管変性、挿入はウイルスの電子顕微鏡写真

② 遡及的ラナウイルス感染症の調査：遡及的調査によって、カミサンショウウオの大量死事例よりラナウイルス感染症を見出した。本事例では、成体を含む飼育個体80匹全てが2週間以内に死亡しており、野外採取個体の導入がきっかけとなり流行がおきた。病理学的には皮膚潰瘍、肝細胞壊死、腎尿細管の硝子滴変性、様々な程度の糸球体壊死などが観察され、電子顕微鏡学的検索にて間質細胞の細胞質内にラナウイルス様のウイルス粒子を認めた。ラナウイルスPCR検査により得られた増幅産物のシーケンス解析を実施したところ、RCV-JPならびにFrogウイルス3とは異なる塩基配列を示したことから、HNVと命名された。

③ RCV-JP、HNVの在来両生類への感染実験：無尾目、有尾目ともに肝細胞変性および糸球体壊死を主体とする病変が観察されたが、皮膚・脾臓病変や症状の有無などに違いがあった。また、実験に用いた両生類すべてにおいて高い致死率(平均死亡率84%)を示した。

また、幼生および水温が高いと致死率が上昇し、生存期間が短縮した。2種のラナウイルスの高病原性ならびに宿主域の広さが明らかになった。なお、HNV 感染実験においてクロサンショウウオ成体の死亡はみられず、HNV のキャリアーになる可能性が示唆された。

表 RCV-JP 感染実験結果

種名	年齢	温度	致死率
アカハライモリ	成体	22°C	100.0%
シリケンイモリ	成体	22°C	100.0%
カスミサンショウウオ	成体	22°C	100.0%
	幼生	22°C	100.0%
		15°C	100.0%
クロサンショウウオ	成体	22°C	66.7%
	幼体		100.0%
トウホクサンショウウオ	幼生	22°C	100.0%
		15°C	100.0%
トウキョウサンショウウオ	幼生	22°C	100.0%
		15°C	80.0%
ヒメアマガエル	成体	22°C	66.7%
トウキョウダルマガエル			100.0%
ヌマガエル			66.7%
ミヤコヒキガエル			33.3%
アズマヒキガエル			100.0%
	幼体		

④ 国内ラナウイルス浸淫調査と季節変動：2009年にラナウイルス感染症が発生した池で、経時的にウシガエル幼生を採取してラナウイルス保有状況を調べたところ、6月8%と8月2%に陽性の動物がみられただけであった。しかしながら、過去の流行時期と同様に9月に陽性率が28%に上昇し、再度流行が起きた時点で90%以上の陽性率を示した。その後、流行が終息した11月には0%になった。なお、同一池に生息する魚類および甲殻類も検索したが、陽性の動物はいなかった。また、他の検査箇所7つ（大阪、京都、東京、神奈川2箇所、埼玉、千葉）のうち、3箇所（千葉、神奈川2）でRCV-JPが検出されたが、流行はみられなかった。また、ウシガエル以外の両生類モリアオガエルの幼生からもRCV-JPが検出された。

検査地によって、陽性率に大差があった。また、流行地であっても流行が起きる時期以外は非常に低率であった。

以上のことから、過去、流行が起きた西日本の特定の地域のみならず、少なくとも3箇所にラナウイルスナが存在することが明らかになった。しかしながら、流行地であっても、変動があり、かつ低率で、今回の調査のみで、ラナウイルスがないという判定はできない。このため、ラナウイルスの保有率の季節変動の把握、モニター動物の探索が必要である。また、なぜ、流行が9月下旬に起こるのか、その機序は不明であった。

両生類の野生個体群の急激な減少は世界的にも大きな問題とされている。特にカエルツボカビやラナウイルスはIUCN（国際自然保護連合）および国際獣疫事務局においても重要な野生生物感染症と認定しており、

世界的な検疫と防除対策の推進が唱われている。本研究課題において得られた成果は、国際的な両生類感染症対策に対して、特にアジア地域の両生類保護という観点から重要な科学的知見を提供するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計12件）

- ① Une Y., Sakuma A., Matsueda H., *et al.*: Ranavirus outbreak in North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008. 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 1146-1147.
- ② Une Y., Kadekaru S., Tamukai K., *et al.*: First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. 2008. *Dis. Aquat. Organ.* 82: 157-160.
- ③ Goka K., Yokoyama J., Une Y., *et al.*: Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes, and possible route of entry into Japan. 2009. *Mol. Ecol.* 18: 4757-4774.
- ④ Tamukai K., Une Y., Tominaga A., *et al.*: Treatment of spontaneous chytridiomycosis in captive amphibians using itraconazole. 2010. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 155-159.

〔学会発表〕（計33件）

- ① Une Y.: First asian report of spontaneous Chytridiomycosis in captive frogs. 26<sup>th</sup> Annual Meeting European Society of Veterinary Pathology. 2008年9月18日. Dubrovnik, Croatia.
- ② Une Y.: Ranavirus infection outbreak in the salamander (*Hynobius nebulosus*) in Japan. 27<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists. 2009年9月11日. Kraków, Poland.
- ③ Une Y.: Origin of the world frog pandemic: Evidence from East Asia supports the novel pathogen theory. 28<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists. 2010年9月9日. Belgrade, Serbia.
- ④ 中島康太: 在来両生類における実験的ウシガエルラナウイルス (RCV-JP) 感染症の病理学的検索. 第149回日本獣医学会学術集会. 2010年3月27日. 日本獣医生命科学大学、東京都.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇根 ユミ (UNE YUMI)

麻布大学・獣医学部 獣医学科・教授

研究者番号： 40160303

(2)研究分担者

松井 久実 (MATSUI KUMI)  
麻布大学・獣医学部 獣医学科・講師  
研究者番号： 70367019

(3)連携研究者

五箇 公一 (GOKA KOICHI)  
独立行政法人国立環境研究所・生物多様性  
研究プロジェクト 侵入生物研究チーム・  
主任研究員  
研究者番号：90300847  
村上 賢 (MURAKAMI MASARU)  
麻布大学・獣医学部 獣医学科・教授  
研究者番号：20580330  
田原口 智士 (TAHARAGUCHI SATOSHI)  
麻布大学・獣医学部 獣医学科・准教授  
研究者番号：30312416  
荻原 喜久美 (OGIHARA KIKUMI)・講師  
麻布大学・環境保健学部 衛生技術学科・  
研究者番号：50154381  
太田 英利 (OTA HIDETOSHI)  
兵庫県立大学・自然・環境科学研究所・  
教授  
研究者番号：10201972  
黒木 俊郎 (KUROKI TOSHIRO)  
神奈川県衛生研究所・微生物部 腸管系  
細菌グループ・主任研究員  
福山 欣司 (FUKUYAMA KINJI)  
慶応義塾大学・経済学部 経済学科・准教授  
研究者番号：50199270